



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



GIOVANNA CAROLINE APARECIDA DO VALE

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A COMPÓSITOS
DE ESPONGINA EXTRAÍDAS DE ESPONJAS MARINHAS E
BIOSILICATO® DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO**

SANTOS

2019

GIOVANNA CAROLINE APARECIDA DO VALE

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A COMPÓSITOS
DE ESPONGINA EXTRAÍDAS DE ESPONJAS MARINHAS E
BIOSILICATO® DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de
São Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Fisioterapia.

Orientadora: Julia Risso Parisi
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Renno

SANTOS

2019

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V149e Vale, Giovanna.
EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A COMPÓSITOS
DE ESPONGINA EXTRAÍDAS DE ESPONJAS MARINHAS E
BIOSILICATO @ DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO. /
Giovanna Vale; Orientadora Julia Risso Parisi;
Coorientadora Ana Claudia Muniz Renno. -- Santos,
2019.
46 f. p. ; 30cm

TCC (Graduação - Fisioterapia) -- Instituto Saúde
e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2019.

1. Fotobiomodulação. 2. Biotecnologia marinha. 3.
Biomateriais. 4. Engenharia de tecidos. 5. Reparo
ósseo. I. Parisi, Julia Risso, Orient. II. Renno, Ana
Claudia Muniz, Coorient. III. Título.

CDD 615.82

*Dedico esse trabalho aos meus pais
Ronaldo Vale e Ângela Maria, as minhas
irmãs **Sabrina e Marjhorie**, e a toda a minha
família por todo amor, incentivo e apoio.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus por me guiar durante toda essa caminhada e permitir a finalização deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó, pela confiança, oportunidade, incentivo e por toda a orientação e ensinamentos compartilhados durante esses anos. Muito obrigada por todo apoio.

Agradeço à minha querida orientadora Julia Parisi, por toda troca de experiências, afeto, amizade e incontáveis momentos de felicidade. Sou muito grata por ter uma pessoa tão especial no meu caminho.

A Kelly Fernandes, que me adotou com todo seu coração de mãe. Muito obrigada por todo o conhecimento, confiança e carinho que me transmitiu. Não seria possível finalizar este trabalho sem o seu apoio.

A toda minha família, por sempre me apoiar, torcer pelas minhas conquistas e permitir que eu realizasse o sonho de cursar uma Universidade federal.

Aos meus pais Ronaldo Vale e Ângela Maria, e as minhas irmãs Sabrina e Marjhorie, por sempre ser uma fonte de luz, carinho e muito amor.

Aos meus grandes amigos do grupo de pesquisa, Alan, Matheus, Patrícia, Ingrid e Thalita por todo apoio, companheirismo e auxílio em todos os momentos.

Aos meus amigos de graduação por todo apoio, em especial a Ingrid e a Helena por toda amizade durante esses anos.

Ao Henrique, por estar ao meu lado durante toda essa caminhada e pelo amor incondicional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e viabilização deste trabalho.

Obrigada a todos que contribuíram para execução desse trabalho, de maneira direta ou indireta.

RESUMO

Fraturas que acometem o sistema ósseo vêm aumentando significativamente, relacionando-se a um elevado custo socioeconômico e altos índices de morbidade e mortalidade. Nesse contexto, a engenharia do tecido ósseo vem desenvolvendo novos biomateriais e recursos terapêuticos para aperfeiçoar o reparo ósseo. Dentre os métodos de tratamento destaca-se o uso da fotobiomodulação (PBM) associada à utilização de biomateriais. Além disso, o ecossistema marinho é um ambiente amplamente rico para o fornecimento de matéria prima para desenvolver produtos biotecnológicos a serem utilizados no reparo ósseo. Um dos organismos marinhos alvo são as esponjas marinhas, que possuem em seu esqueleto um componente orgânico, nomeada de espongina (SPG), que apresenta propriedades em potencial para otimizar o reparo ósseo. Ainda, o Biosilicato (BS) é uma vitrocerâmica que apresenta resultados efetivos e promissores durante o processo de reparo ósseo. Desta forma, o objetivo deste projeto foi avaliar através de testes *in vivo* os efeitos da PBM associado ou não a compósitos de BS/SPG no reparo de defeitos ósseos induzidos na calota craniana de ratos. Para isso, foram utilizados 48 ratos *Wistar* submetidos ao procedimento cirúrgico para realização do defeito ósseo, distribuídos em 3 grupos experimentais: Grupo CG: os animais foram submetidos ao defeito ósseo, não receberam nenhum tipo de tratamento; Grupo BS/SPG: os animais foram submetidos ao defeito ósseo e receberam o implante de Biosilicato®/Espongina; Grupo BS/SPG + PBM: os animais foram submetidos ao defeito ósseo, receberam o implante de Biosilicato®/Espongina e também ao tratamento com fotobiomodulação. Os parâmetros utilizados na fotobiomodulação foram: 808 nm; 30 mW; 1,07 W/cm²; 30 J/cm² e 28 segundos. Ainda, os animais foram eutanasiados 15 e 45 após o procedimento cirúrgico. Foram realizadas as análises de histopatologia, morfometria e imunoistoquímica. A análise histopatológica demonstrou que os animais BS/SPG + PBM após 15 dias da cirurgia apresentaram uma degradação inicial do material do material, ainda a presença de osso neoformado nas periferias do defeito foi observada, da mesma maneira que os animais do grupo BS/SPG. Após 45 dias da cirurgia para os grupos BS/SPG e BS/SPG + PBM observou-se a presença de osso neoformado em toda a extensão do defeito e foi evidenciado uma maior degradação do biomaterial, com a presença de poucas partículas de material remanescentes, circundadas por porções de osteóides. Na análise histomorfométrica valores elevados de volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV (%)) no período inicial da regeneração óssea foi encontrado no grupo BS/SPG + PBM, quando comparados aos demais grupos. Ainda, para o volume osteóide como porcentagem do volume tecidual (OV/TV (%)) e espessura de osteóide (O.Th (μm)), valores mais altos foram observados no grupo BS/SPG + PBM, nos períodos analisados. A análise imunohistoquímica demonstrou maior marcação imunohistoquímica para TGF-β e VEGF nos animais tratados com PBM. Pode-se concluir que o estímulo fornecido pelo PBM associado ao compósito de BS/SPG aumentou a formação óssea no defeito ósseo craniano em ratos. No entanto, novos estudos devem ser realizados para fornecer informações adicionais a respeito da degradação do material e a regeneração óssea a longo prazo.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, biotecnologia marinha, biomateriais, engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Fractures that affect the bone system have been increasing significantly, related to a high socioeconomic cost and high morbidity and mortality rates. In this context, bone tissue engineering has been developing new biomaterials and therapeutic resources to improve bone fracture repair. Among the treatment methods is the use of photobiomodulation (PBM) associated with the use of biomaterials. In addition, the marine ecosystem is a broadly rich environment for the supply of raw materials to develop biotechnology products for use in bone repair. One of the target marine organisms is the marine sponges, which have in their skeleton an organic component, called spongin (SPG), which has potential properties to optimize bone repair. Also, Biosilicate (BS) is a glass ceramic that presents effective and promising results during the bone repair process. Thus, the objective of this project was to evaluate through *in vivo* tests the effects of PBM associated or not with BS / SPG composites on the repair of bone defects induced in the skullcap of rats. For this, 48 Wistar rats were submitted to the surgical procedure to perform the bone defect, distributed into 3 experimental groups: CG Group: the animals underwent bone defect, received no treatment; BS/SPG group: the animals underwent bone defect and received the Biosilicate/Spongin implant; Group BS/SPG + PBM: the animals underwent bone defect, received the Biosilicate/Spongin implant and also the treatment with photobiomodulation. The parameters used in photobiomodulation were: 808 nm; 30 mW; 1.07 W/cm²; 30 J/cm² and 28 seconds. In addition, the animals were euthanized 15 and 45 after the surgical procedure. Histopathology, morphometry and immunohistochemistry analyzes were performed. Histopathological analysis showed that BS/SPG + PBM animals after 15 days of surgery showed an initial degradation of the material of the material, yet the presence of newly formed bone in the defect peripheries was observed, just as the animals of the BS / SPG group. . After 45 days of surgery for the BS/SPG and BS/SPG + PBM groups, the presence of newly formed bone was observed throughout the defect and a greater degradation of the biomaterial was evidenced, with the presence of few remaining particles of material surrounded by portions of osteoid. In the histomorphometric analysis, high BV/TV values (%) in the initial period of bone regeneration were found in the BS/SPG + PBM group when compared to the other groups. In addition, for OV/TV (%) and O.Th (μm), higher values were observed in the BS/SPG + PBM group in the analyzed periods. Immunohistochemical analysis showed greater immunological labeling for TGF-β and VEGF in PBM-treated animals. It can be concluded that the stimulation provided by PBM associated with BS / SPG composite increased bone formation in cranial bone defect in rats. However, further studies should be performed to provide additional information regarding material degradation and long-term bone regeneration.

Key-Words: Photobiomodulation, marine biotechnology, biomaterials, tissue engineering.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	JUSTIFICATIVA	17
3.	OBJETIVOS	17
	3.1. Objetivo Geral	17
	3.2. Objetivos Específicos	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS	18
	4.1. Materiais	18
	4.1.1. Biosilicato®	18
	4.1.2. Espongina	18
	4.1.3. Preparação dos scaffolds	20
	4.2. Fotobiomodulação	20
	4.3. Estudos in vivo	22
	4.3.1. Animais utilizados nos experimentos	22
	4.3.2. Grupos Experimentais	22
	4.3.3. Modelo experimental de defeito na calota craniana em ratos	23
	4.3.4. Colocação dos implantes	23
	4.3.5. Eutanásia e coleta das amostras	24
5.	ANÁLISES	24
	5.1. Análise histopatológica e histomorfométricas	24
	5.2. Análise imunohistoquímica	25
6.	ANÁLISE DOS DADOS	26
7.	RESULTADOS	26
	7.1. Análise Histológica	26
	7.2. Análise Morfométrica	30
	7.3. Análise Imunohistoquímica	32
8.	DISCUSSÃO	36
9.	CONCLUSÃO	39
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
11.	ANEXOS	47

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	- Por cento
±	- Mais ou menos
<	- Menor
®	- Marca registrada
°C	- Grau Celsius
cm ²	- Centímetro Quadrado
µm	- Micrômetro
BS	- Biosilicato
BS/SPG	- Grupo Biosilicato [®] /Espongina
BS/SPG + PBM	- Grupo Biosilicato [®] /Espongina + Fotobiomodulação
BV	- Volume de tecido ósseo neoformado
Ca	- Cálcio
CEDEME	- Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais
CG	- Grupo Controle
CMC	- Carboximetil Celulose
Col	- Colágeno
et. al.	- Entre outros
g	- Gramas
GaAlAs	- Arseneto de Gálio e Alumínio
h	- Hora
IgG	- Imunoglobulina G

J	- Joule
J/cm ²	- Joule por centímetro ao quadrado
M	- Massa molar
min	- Minutos
mg/mL	- Miligrama por mililitro
mg/kg	- Miligrama por quilograma
mm	- Milímetro
MMA	- Monômero metilmetacrilato
ml	- Mililitro
MPa	- Megapascal
mW	- Miliwatt
N	- Newton
Na	- Sódio
nm	- Nanômetro
O	- Oxigênio
O.Th	- Espessura osteóide
OV	- Volume osteóide
P	- Fósforo
PBS	- Solução de Tampão Fosfato (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PMMA	- Polimetilmetacrilato
Runx-2	- Fator de transcrição relacionado à Runt do tipo 2 (do inglês: <i>runt-related transcription factor-2</i>)

s	- Segundo
Si	- Silício
SPG	- Espongina
TGF- β	- Fator de transformação do crescimento - β (do inglês: <i>transforming growth factor-β</i>)
TV	- Volume do defeito
VEGF	- Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
W	- Watt
W/cm ²	- Watt por centímetro ao quadrado
x	- Vezes
α	- Alfa
β	- Beta
λ	- Comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido altamente dinâmico que possui a capacidade de regeneração frente a lesões, que em sua maioria é capaz de restaurar a sua arquitetura e as propriedades mecânicas do tecido (MARSELL e EINHORN, 2011; SOARES *et al.*, 2013). Frente a uma lesão ou fratura, o reparo do tecido ósseo ocorre na tentativa de restaurar a estrutura e função normal do tecido ósseo frente a uma lesão ou fratura. Este pode ser definido como um processo regenerativo altamente complexo, que inclui a interação de uma série de eventos biológicos que determinarão a restauração da integridade deste tecido, com a participação coordenada de células, vias biológicas e moléculas (CLAES e WILLIE, 2007; PAPE *et al.*, 2010; DIMITRIOU *et al.*, 2011). Múltiplos fatores regulam esta cascata de eventos moleculares afetando diferentes células, dentre elas, fibroblastos, macrófagos, osteoblastos e osteoclastos, através de vários processos como migração, proliferação, diferenciação, inibição e síntese de proteínas extracelulares (PAPE *et al.*, 2010; DIMITRIOU *et al.*, 2011).

No entanto, no decorrer do processo de reparo podem ocorrer alterações, tais como presença de infecção, suprimento sanguíneo insuficiente, dentre outros fatores que podem culminar na deficiência da regeneração e consequentemente, no atraso da consolidação e mesmo na não-união óssea, resultando em recidivas cirúrgicas, aumento do risco de infecções e complicações, morbidade significativa e perda da função (MARSELL e EINHORN, 2010; LIU *et al.*, 2017). Estudos mostram que, 5 a 10% dos casos de fraturas podem culminar em um processo de consolidação anormal e resultar em um atraso na consolidação ou não união óssea (CALORI *et al.*, 2007; CLAES *et al.*, 2012).

Aziziyeh *et al.*, (2019) estimam que nos próximos 5 anos, ocorram mais de 4 milhões de novas fraturas no Brasil, México, Colômbia e Argentina. Somente no Brasil, estima-se que no ano de 2020 ocorram cerca de 140 mil fraturas de quadril relacionadas à osteoporose subindo para 160 mil em 2050 (BACCARO *et al.*, 2018). As fraturas do quadril são as mais graves e aumentam a taxa de mortalidade em 12 a 20% nos dois anos seguintes à fratura (KANIS *et al.*, 2018). Ainda, as fraturas ósseas constituem de 10-25% de todas as lesões pediátricas (HODLER *et al.*, 2017).

O número elevado de fraturas, culmina em altos custos para o sistema de saúde público e privado. Estima-se que por tratamento de cada caso de não união óssea, são gastos entre dez e cem mil euros na Europa (STANOVICI *et al.*, 2016). Somente nos Estados Unidos, anualmente é estimado que ocorram mais de dois milhões de fraturas relacionadas à

osteoporose, especialmente em mulheres (70%), com elevada taxa de morbimortalidade e gerando um custo que superam os 25 bilhões de dólares (KWEON *et al.*, 2018).

Em face do exposto, pesquisas com o intuito de aprimorar o reparo ósseo são de extrema importância, principalmente em casos como, por exemplo, fraturas de grande extensão e/ou pacientes com outras doenças associadas (QUARTO e GIANNONI *et al.*, 2016).

Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos de tratamento na tentativa de aperfeiçoar a qualidade e acelerar o tempo de reparo de fraturas ósseas. Dentre os métodos de tratamento que vêm sendo investigados para serem utilizados na Engenharia do tecido ósseo podemos destacar o uso de fotobiomodulação (PBM) associado ao uso de biomateriais (AMID *et al.*, 2014; JONES, 2015).

A aplicação da fotobiomodulação é uma abordagem clínica promissora, com efeito positivo no tratamento de fraturas ósseas, processos inflamatórios, dor e distúrbios musculoesqueléticos. Ainda, trata-se de um método de tratamento não-invasivo e com custo relativamente baixo (FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2013; ASSIS *et al.*, 2015; ACAR *et al.*, 2016). Adicionalmente, a PBM interage com biomoléculas específicas nas células, iniciando uma cascata de reações no citoplasma e na membrana celular, conectadas a alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de Ca^{+2} , ATP e outros). Essas interações levam a mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa de consumo de O_2 e alteração do potencial de membrana (PRINDEZE, MOFFATT e SHUPP, 2012). Com isso, são promovidas as respostas indiretas da fotobiomodulação nos tecidos, entre eles os efeitos regenerativo, analgésico e modulador da inflamação (KARU, 1989; KARU e KOLYAKOV, 2005).

Diversas evidências demonstram que a fotobiomodulação possui a capacidade de estimular a proliferação de células envolvidas no processo de cicatrização, além de possuir grande potencial osteogênico e induzir respostas fotobiológicas, acelerando o depósito e a organização do osso recém-formado (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2014; ASSIS *et al.*, 2015; MEDALHA *et al.*, 2016; ACAR *et al.*, 2016).

Constatou-se através de estudos *in vitro* e *in vivo* que a utilização de fotobiomodulação aumentou a proliferação fibroblástica e de osteoblastos, estimulou a formação de matriz óssea mineralizada e o aumento da síntese e deposição de colágeno (RENNO *et al.*, 2007; FÁVARO-PIPI *et al.*, 2010; BOSSINI *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; BRITENOVAZQUEZ *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*,

2016). Adicionalmente, a fotobiomodulação é eficaz acelerando a contração de feridas por queimaduras, melhorando seu processo de cicatrização (FANTINATI *et al.*, 2016).

Dessa maneira, as claras evidências estão estabelecidas na literatura que a fotobiomodulação apresenta um grande potencial de proliferação de células osteogênicas, constituindo, assim, um método de tratamento inovador, não invasivo, podendo ser utilizado como um coadjuvante ao uso de biomateriais para constituir uma terapêutica eficaz para o tratamento de fraturas de difícil consolidação.

No entanto, em casos de defeito de grande extensão, apenas a terapia com a fotobiomodulação pode não ser suficiente para otimizar o reparo ósseo. Dessa forma, a utilização de biomateriais, vêm sendo investigados principalmente pelas suas propriedades osteogênicas, que interagem com o tecido ósseo após lesões, doenças ou falhas no processo de reparo (WINKLER *et al.*, 2018). Dentre as estratégias biotecnológicas, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com base na biodiversidade marinha vem ganhando destaque (SILVA *et al.*, 2014; GRANITO *et al.*, 2017).

O ecossistema marinho constitui um ambiente amplamente rico para o fornecimento de matéria prima para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para serem utilizados na engenharia do tecido ósseo. Cabe ressaltar, que a zona costeira brasileira apresenta um patrimônio natural qualificado como de grande valor ambiental, apresentando recursos altamente valiosos, tanto sob a ótica ecológica quanto socioeconômica (OLIVEIRA e NICOLODI, 2012). O interesse nos organismos marinhos, consiste no fato de que os mesmos, possuem uma série de metabólitos e compostos bioativos de defesa química, os quais exibem também potencial antibacteriano, antiviral e anti-inflamatório (KIM *et al.*, 2013; CONSTANTINO *et al.*, 2018).

Um dos organismos marinhos que se destaca ao apresentar um potencial terapêutico para diversas aplicações biomédicas, inclusive para a engenharia de tecido ósseo são as esponjas marinhas (WANG *et al.* 2009; SILVA *et al.*, 2014; GRANITO *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2019). O Brasil com sua extensa costa apresenta cerca de 390 espécies de esponjas marinhas catalogadas, distribuídas em todas as regiões (MURICY *et al.*, 2011). Ainda, é importante salientar que as esponjas marinhas são um recurso renovável, fator que possibilita a exploração sustentável das mesmas para fins científicos (GALITZ *et al.*, 2018; GÖKALP *et al.*, 2019).

Recentemente, alguns trabalhos vêm demonstrado que as esponjas marinhas podem atuar como *bioscaffold* ou como fonte de matéria prima que podem ser utilizados na engenharia de tecido ósseo (HEINEMANN *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2011; PALLELA *et al.*,

2012). Isto se deve por sua composição e estrutura semelhantes ao tecido ósseo, possuindo uma matriz extracelular que suporta a ligação, migração e proliferação celular (BELL e BARNES *et al.*, 2001; NANDI *et al.*, 2014).

Os atrativos para produção de estudos utilizando estes organismos marinhos originaram-se, primordialmente, pelo fato destes possuírem um esqueleto baseado em dois componentes, a espongina (SPG) e a biosilica (WANG *et al.*, 2014; JONES *et al.*, 2015).

A espongina, componente orgânico do esqueleto das esponjas, é definida como uma proteína de colágeno modificada, semelhante à dos vertebrados. Apresenta também uma orientação das fibras de colágeno análogo à observada no osso trabecular humano (LIN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014; GRANITO *et al.*, 2017). Sabe-se que o colágeno é o principal constituinte da parte orgânica da matriz óssea humana, sendo, portanto, um dos componentes naturais mais utilizados como *scaffolds* para a bioregeneração tecidual (CEN *et al.*, 2008).

Por sua vez, a biosilica, componente inorgânico, possui íons de sílica, tal elemento conhecido por estimular a neoformação óssea, mediante a atração de células osteoprogenitoras e estímulo a sua diferenciação em osteoblastos. Além disso, mostrou-se não tóxica para células de mamíferos, sugerindo sua biocompatibilidade (LEYS e HILL, 2012; WANG *et al.*, 2014; HENCH *et al.*, 2015; JONES *et al.*, 2015; GRANITO *et al.*, 2017).

Alguns estudos vêm comprovando a importância da espongina e seu potencial promissor no reparo ósseo, podendo ser utilizada para a fabricação de *scaffolds* dentro da engenharia do tecido ósseo (GREEN *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014; GRANITO *et al.*, 2017). Por serem organismos filtradores, as esponjas apresentam características estruturais únicas para facilitar o fluxo de água, como a arquitetura tridimensional com poros interconectados, constituindo uma estrutura similar à do tecido ósseo (MURICY e HAJDU, 2006; LIN *et al.*, 2011).

O estudo conduzido por Heinemann *et al.*, (2007) utilizou o colágeno derivado de esponja marinha da espécie *Chondrosia reniformis*, juntamente com modelos de sílica para produção de um hidrogel que permitiu a adesão, proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais em células osteoblásticas. Além disso, Pallela *et al.*, (2012) utilizou dos compósitos de quitosana, hidroxiapatita e colágeno da espécie *Ircinia fusca* de esponja marinha, preparados através da metodologia de liofilização, onde as células semelhantes a osteoblastos MG-63 puderam se aderir e proliferar, propondo este sistema para o reparo do tecido ósseo. Adicionalmente, Lin *et al.*, (2011) constataram que osteoblastos primários murinos semeados na superfície de esponjas marinhas da espécie *Callyspongiidae*,

precisamente na rede de fibras colágenas presentes em seu esqueleto, apresentam um aumento da expressão gênica de marcadores osteoblásticos como da fosfatase alcalina (após 7 dias) osteocalcina e osteopontina (após 7, 14 e 21 dias) e com a coloração de Von Kossa, os nódulos de mineralização foram evidentes após 21 dias. Ainda, em um estudo conduzido *in vitro*, Parisi *et al.* (2019) observaram que compósitos manufaturados a partir de hidroxiapatita e espongina foram capazes de aumentar a viabilidade e proliferação celular de fibroblastos e osteoblastos.

Mediante o exposto acima, evidências comprovam a biocompatibilidade e as propriedades osteogênicas da espongina, extraída de espécies diferentes de esponjas marinhas constatando seu grande potencial para utilização como enxerto ósseo (GREEN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2011; PALLELA *et al.*, 2012). Apesar dos resultados benéficos da utilização da espongina, acredita-se que em defeitos críticos (fraturas de grande extensão) e em algumas condições patológicas, como no caso de osteoporose e principalmente vascularização inadequada, seja necessário adicionar um material com um alto índice de bioatividade, formando assim um compósito. Com esse intuito, acredita-se que a associação da Espongina e do Biosilicato (BS), em forma de compósito, pode unir as propriedades dos dois materiais e constituir um material com uma performance biológica superior para ser utilizados no reparo ósseo.

O Biosilicato é uma vitrocerâmica, que apresenta elementos químicos na sua composição que são liberados em forma de íons, formando uma camada de hidroxycarbonatoapatita na superfície do BS, a qual possibilita o estabelecimento de uma ligação química extremamente forte com o tecido ósseo e uma semelhança estrutural e química à fase mineral do osso (RAVAGNANI, 2003).

Diversos trabalhos mostram efeitos positivos da utilização do Biosilicato[®], sendo este capaz de promover uma maior deposição de tecido ósseo neoformado, aumentar as propriedades mecânicas de calo ósseo em defeitos ósseos em tíbias de ratos, aumentar a marcação de alguns imunomarcadores como Runx-2, VEGF entre outros (MOURA *et al.*, 2007; GRANITO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2011; MATSUMOTO *et al.*, 2012; KIDO *et al.*, 2013; KIDO *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016). Acredita-se, portanto, que a Espongina utilizada associada ao Biosilicato[®] pode ser um material promissor para a utilização em defeitos ósseos de grande extensão. Diante do exposto, fica evidente que tanto a fotobiomodulação quanto os biomateriais apresentam um importante potencial osteogênico. Em situações críticas como em defeitos de grande

extensão, essas terapias isoladas podem não ser suficientes para acelerar o processo de consolidação.

Assim, a hipótese deste projeto é que os compósitos de Biosilicato[®]/Espongina sejam biocompatíveis e que a associação desses compósitos com a fotobiomodulação poderia constituir uma intervenção terapêutica altamente inovadora e eficaz para acelerar o reparo ósseo.

2. JUSTIFICATIVA

Diante do contexto explanado, torna-se evidente que fraturas que acometem o sistema ósseo vêm aumentando de forma significativa, relacionando-se a um elevado custo socioeconômico. Assim, com designo de diminuir os altos índices de morbidade e mortalidade advindos destes quadros clínicos, a realização de estudos que favoreçam o reparo ósseo e minimizem o tempo de consolidação são de grande importância. Dessa maneira, estratégias biotecnológicas a partir de materiais extraídos da biodiversidade marinha, associados a outros recursos destacam-se por sua inovação, podendo desenvolver novas abordagens terapêuticas mais efetivas e seguras.

Embora este projeto, de acordo com os achados apresentados, evidencie a biocompatibilidade e os efeitos osteogênicos dos componentes das esponjas marinhas, há uma carência de estudos realizados *in vivo* na literatura. Ademais, os potenciais das espécies marinhas presentes na costa brasileira não foram investigados até o momento. Assim, em suma, este projeto visa suprir parte desta lacuna e gerar novas informações a respeito dos efeitos da fotobiomodulação associados a compósitos de Biosilicato[®]/Espongina, com o intuito de desenvolver novas intervenções terapêuticas mais eficazes para o tratamento de enfermidades que acometem o sistema ósseo.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da fotobiomodulação, associados ou não à compósitos de Biosilicato[®]/Espongina, durante o reparo de defeitos ósseos induzidos na calota craniana de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de tecido de granulação, presença de osteóide, neoformação óssea e resíduos do material através de análises histopatológicas.
- Avaliar a área de tecido ósseo neoformado, o volume e espessura de osteóide, através de análises histomorfométricas.
- Verificar a presença de imunomarcadores: fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), através de análises de imunohistoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi realizado no laboratório de Biomateriais e Engenharia Tecidual do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (Labetec-UNIFESP) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) protocolada sob o nº 4331220318.

4.1. Materiais

4.1.1. Biosilicato[®]

O material bioativo utilizado neste estudo foi o Biosilicato[®]. Este é uma vitrocerâmica altamente bioativa, apresentando os elementos químicos silício, oxigênio, sódio, cálcio e fósforo (Si, O, Na, Ca e P), que serão liberados em solução na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$, Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Os detalhes da composição e do tratamento térmico estão descritos na patente WO 2004/074199. O Biosilicato[®] será produzido e fornecido pelo Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da (UFSCar) e pela empresa Vitrovita – Instituto de Inovação em Vitrocerâmicos São Carlos, SP.

4.1.2. Espongina

Foi selecionada uma espécie de esponja marinha da Classe *Demospongiae*, por apresentar uma maior quantidade de espongina e estarem mais disponíveis na região onde foram coletadas. Neste estudo, foi utilizada a espécie *Aplysina fulva* (Reino: Animalia; Filo:

Porifera; Classe: Demospongiae; Subclasse: Verongimorpha; Ordem: Verongiida; Família: Aplysinidae; Gênero: Aplysina; Espécie: *Aplysina fulva*) (Figura 1).

Este trabalho foi realizado em colaboração do Prof. Dr. Márcio Reis Custódio, do Departamento de Fisiologia Geral, do Instituto de Biociências da USP. A autorização para a coleta permanente das esponjas em ambiente marinho foi aprovada pelo SISBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) sob o parecer número 28917-1, que regulamenta a coleta de materiais biológicos para fins científicos.

As amostras foram coletadas em costões de alto hidrodinamismo, na zona entremarés, na área de Praia Grande (23°49'23.76"S, 45°25'01.79"W, São Sebastião, Brasil). A coleta ocorreu com o auxílio de uma lâmina de bisturi. As amostras foram imediatamente lavadas com água salgada e transportadas para o laboratório (Labetec-UNIFESP), onde foram realizadas três etapas de lavagem em água corrente, com o intuito de remover os *debris* celulares. As amostras foram cortadas em pequenos pedaços e adicionadas em solução 100mM Tris-HCl buffer (pH 9,5; 10mM EDTA; 8 M Ureia; 100mM de 2-Mercaptoetanol). O pH da solução foi ajustado para 9 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e deixado sob agitação contínua em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, os extratos resultantes foram centrifugados (Eppendorf, São Paulo, Brasil) (5000G; 2°C; 5 min). As frações sólidas foram descartadas e ao precipitado foi adicionado uma solução de ácido acético 0,1 M até pH 4, e uma nova centrifugação do material foi realizada (18.000G; 2 ° C; 40 min). O precipitado foi suspenso em água destilada e submetido à nova centrifugação (18.000G; 2°C; 40 min). A SPG na forma de *pellet* foi então congelada a -20°C, liofilizada, triturada, peneirada (180 µm, densidade de 1,347 g/cm³) e armazenada em temperatura ambiente (SWATSCHEK *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2019).



Figura 1. Esponja marinha *Aplysina fulva*.

4.1.3. Preparação dos *scaffolds*

Os compósitos de Biosilicato[®]/Espingina foram obtidos através da adição de Biosilicato[®] nas proporções de 80% de Biosilicato[®] e 20% de espongina, esta proporção foi escolhida para simular a composição química do tecido ósseo e corrobora com os resultados positivos do estudo conduzido por Fernandes *et al.* (2019) utilizando esta proporção.

Para este estudo foi utilizado um *scaffold* com diferentes materiais e formulações. Foi utilizada a menor quantidade do polímero polimetilmetacrilato (PMMA) suficiente para agregar os diferentes materiais. Além disso, o Carboximetilcelulose (CMC) foi usado como material porogênico e a quantidade utilizada para esse componente em cada compósito é para induzir porosidade de 60% (LOPEZ-HEREDIA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; HAACH *et al.*, 2014). Todos os materiais (ou seja, PMMA, BS, SPG e CMC) em pó e H₂O destilada foram pesados e misturados em um recipiente de silicone usando uma espátula, na proporção correspondente ao grupo estudado (Tabela 1). Depois disso, foi adicionada água destilada, a combinação foi misturada, seguida pela adição de monômero metilmetacrilato (MMA), para produzir a ligação cruzada. Em seguida, a mistura foi rapidamente transferida para um molde de silicone de 6 mm de diâmetro × 2 mm de altura. Posteriormente, os moldes foram selados e submetidos a uma câmara de ar sob pressão a 0,6 MPa por 30 min, para degradação do CMC e criação dos poros. Após a retirada, já não mais selados, os moldes foram secos a vácuo (10⁻³ Torr) por 15 min e os compósitos foram removidos dos moldes de silício. Logo após as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno (Acecil, Campinas, São Paulo, Brasil) e estocadas em temperatura ambiente (FERNANDES *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Formulações experimentais de compósitos expressas em gramas (g)

Grupo	PMMA (g)	MMA (g)	BS (g)	SPG (g)	CMC (g)	Água (g)
BS/SPG 80/20	0.236	0.472	0.368	0.092	0.043	0.565

4.2. Fotobiomodulação

O aparelho utilizado neste estudo foi um modelo portátil de Laser DMC, classe 3B Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda 808 nm e emissão contínua. Os parâmetros da fotobiomodulação utilizados foram: comprimento de onda de 808 nm, potência de saída de 30

mW, densidade de potência de $1,07 \text{ W/cm}^2$, área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, divergência de 1.5° , na fluência de 30 J/cm^2 , energia total $0,8 \text{ J}$ e tempo 28 segundos. Os protocolos de tratamento com fotobiomodulação foram iniciados imediatamente após o procedimento cirúrgico e foram realizadas a cada 48 horas, totalizando 6 aplicações para os grupos eutanasiados no 15º dias e 18 aplicações nos que foram eutanasiados no 45º dia. A aplicação do laser foi realizada em um único ponto no centro da região do defeito ósseo. Nas aplicações, utilizamos a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido e as irradiações foram realizadas sempre no mesmo horário.

Tabela 2 - Parâmetros da Fotobiomodulação

Parâmetros	Valores
Potência de saída	30 mW
Comprimento de onda	808 nm (infravermelho)
Tipo de emissão	Contínua
Área do feixe	0.028 cm^2
Densidade de energia	30 J/cm^2
Densidade de potência	$1,07 \text{ W/cm}^2$
Tempo de irradiação	28 s
Energia total	0.8 J
Modo de aplicação	Pontual em contato com a pele do animal no centro da região do defeito ósseo

4.3. Estudos *in vivo*

Os estudos foram conduzidos conforme o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

4.3.1. Animais utilizados nos experimentos

Neste trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e com peso corporal médio de 300-350 gramas no início do experimento, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biociências da UNIFESP, alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em regime de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura controlada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Todos os animais foram submetidos à cirurgia para a confecção de defeitos ósseos nas calotas cranianas. As cirurgias foram realizadas de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (DBCA), sob condições padrão de assepsia e anestesia geral. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg), xilasina (8 mg/kg), acepromazina (1 mg/kg) e fentanil (0,05 mg/kg) com doses de acordo com o peso corporal do animal. No pós-operatório foi aplicado uma dose única do antibiótico cefalotina (60 mg/kg) e o analgésico cloridrato de tramadol (2 mg/kg) de 8 em 8 horas durante os 3 primeiros dias. Além disso, os animais foram mantidos por algumas horas em ambiente aquecido com a finalidade de se evitar hipotermia.

4.3.2. Grupos Experimentais

Foram utilizados 48 animais para a realização do modelo experimental de defeito na calota craniana de ratos. Os animais foram pesados e distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos para cada modelo experimental utilizado neste estudo (com 16 animais cada):

Grupo Controle (CG): os animais deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo, não receberam nenhum tipo de tratamento;

Grupo Biosilicato[®]/Espingina (BS/SPG): os animais deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e receberam o implante de Biosilicato[®]/Espingina;

Grupo Biosilicato[®]/Espongina + Fotobiomodulação (BS/SPG + PBM): os animais deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo, receberam o implante de Biosilicato[®]/Espongina e foram submetidos ao tratamento com fotobiomodulação.

Todos os grupos foram divididos em 2 subgrupos, compostos por 8 animais cada, para a realização das análises em diferentes datas de sacrifício. O subgrupo A foi eutanasiado no 15º dia após a cirurgia, o subgrupo B foi eutanasiado no 45º dia após o procedimento cirúrgico.

4.3.3. Modelo experimental de defeito na calota craniana em ratos

Para verificação da ossificação intramembranosa foi utilizado o modelo de defeito crítico em calota craniana em ratos. Após o efeito do anestésico, foi realizada a tricotomia digital da região mediana da calota craniana dos ratos e os animais foram posicionados em decúbito ventral para acesso à calvária. A anti-sepsia foi realizada com solução aquosa de polivinilpirolidona 1% (Ceras Johson, Rio de Janeiro, Brasil). Sobre a pele da calvária, na linha média, foi realizada a incisão para posterior descolamento dermo-periostal, que permitiu o acesso ao tecido ósseo. Uma broca odontológica tipo trefina apresentando diâmetro interno de 8 mm, montada em peça reta em motor de baixa rotação, foi utilizada para realizar o defeito ósseo na calvária dos animais, irrigado com soro fisiológico para evitar queimadura do tecido ósseo, removendo-se totalmente a díploe, permanecendo intacta a meninge dura-mater.

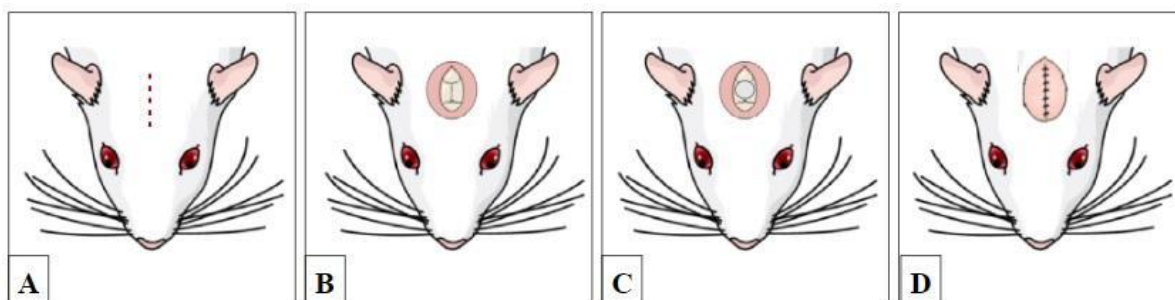


Figura 2. Imagem ilustrativa do modelo de defeito ósseo induzido em calota craniana de ratos. A: Incisão para a exposição do crânio; B: Calota craniana exposta; C: Realização do defeito ósseo circular de 8mm; D: Sutura e higienização do local.

4.3.4. Colocação dos implantes

Logo após a realização dos defeitos ósseos, os *scaffolds* dos biomateriais foram implantados justapostos no local do defeito, de acordo com cada grupo experimental (descrito

acima). Os animais do grupo controle não receberam implante e o defeito ósseo será preenchido com coágulo por sangramento espontâneo da área lesada. Em seguida, a musculatura e a pele foram suturadas com fio cirúrgico 4-0 Ethicon. Por fim, os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso à água e ração até o momento da eutanásia.

4.3.5. Eutanásia e coleta das amostras

Os animais sofreram eutanásia por meio de overdose de anestésico 240 mg/Kg de Cetamina e 24 mg/Kg de Xilazina ao 15º e 45º dia de pós-operatório, de acordo com cada subgrupo experimental. Imediatamente após, foi realizada a ressecção cirúrgica completa das calotas dos animais utilizando um sico circular de lâmina diamantada fixada em uma peça de mão reta de micromotor elétrico.

5. ANÁLISES

As análises foram realizadas, no Laboratório de Biomateriais e Engenharia Tecidual do Departamento de Biociências da UNIFESP (Labetec), *campus* Baixada Santista.

5.1. Análise histopatológica e histomorfométricas

Imediatamente após a retirada, as calotas cranianas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Logo após, as amostras foram desidratadas durante 3 dias em álcool 70%, desidratadas por completo em álcool 100% durante mais 5 dias e, finalmente, diafanizadas em tolueno por 1 dia para inclusão em metilmetacrilato. Após a inclusão, foram confeccionadas lâminas com cortes semi-seriados de 5 µm de espessura utilizando um micrótomo (Leica Microsystems, SP 1600, Nussloch, Alemanha) e estas foram corados pela técnica de Tricrômio de Goldner, a qual visa corar o tecido ósseo mineralizado em verde, tecido osteóide em vermelho intenso, tecido de granulação em rosa claro e núcleos de células em roxo. Foi realizada uma análise qualitativa das lâminas, através da descrição morfológica dos defeitos e que cumpriu os seguintes critérios: tecido de granulação, presença de biomaterial e neoformação óssea (osso primário e secundário).

Na análise histomorfométrica, foi utilizado um microscópio (Labophot 2ª, Nikon) acoplado a placa digitalizadora e programa semi-automático Osteomesure[®] (Osteometrics,

Atlanta, GA, USA). Inicialmente, foi realizado o contorno de toda a extensão do defeito ósseo em um aumento de 200x. Ainda, dentro da área do defeito, as áreas de tecido ósseo neoformado e áreas de osteóides foram contornadas, assim ocorreu a obtenção de índices histomorfométricos estáticos seguindo nomenclatura padronizada por Parfitt et al. (1988): volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV, %), volume osteóide como porcentagem do volume tecidual (OV/TV, %) e espessura osteóide (O. Th, μ m). Os valores foram apresentados com a média e desvio padrão de cada grupo examinado. A avaliação foi realizada, por dois avaliadores, de maneira cega quanto ao grupo.

5.2. Análise imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica foi utilizado o método avidina-biotina-peroxidase. A resina foi removida com xilol/clorofórmio e as amostras foram re-hidratadas em etanol e pré-tratadas com 0,01 M de tampão de ácido cítrico (pH 6) em um vaporizador durante 5 min. A peroxidase endógena foi inativada usando peróxido de hidrogênio em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 min e com 5% de soro de cabra normal em PBS (10 min). As amostras foram, então, incubadas com o anticorpo primário: fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF, Santa Cruz Biotechnology, USA) com a concentração 1:200 e com o fator de crescimento transformante beta (anti-TGF- β , Santa Cruz Biotechnology, USA) também com a concentração de 1:200, por 24 horas. Posteriormente, utilizou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos e as amostras foram incubadas (complexo avidina-biotina conjugado com peroxidase) durante 30 min. Para a visualização dos complexos, foi aplicada diaminobenzidina (5 min) e contra corados com Hematoxilina de Harris (Merck) por 4 min. Com a análise imunohistoquímica, foi possível detectar a imunoexpressão de marcadores e seus locais de ocorrência no modelo de defeito ósseo sugerido. A imunoexpressão de genes relacionados à angiogênese (VEGF e TGF- β) foi realizada qualitativamente (presença e localização dos imunomarcadores) e semiquantitativamente em 5 campos predeterminado dentro da área do defeito ósseo usando um microscópio de luz comum (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha) de acordo com os escores utilizados em trabalhos prévios (PEDROSA *et al.*, 2009, MATSUMOTO *et al.*, 2012). Na análise semi-quantitativa foi mensurada a imunomarcção nos cortes por porcentagem da área do campo avaliado em: ausente (escore 1, 0%), levemente marcado (escore 2, 1% a 34%), moderadamente marcado (escore 3, 35% a 65%) e intensamente marcado (escore 4, 66% a 100%) (MATSUMOTO *et*

al., 2012; TIM *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2013). Esta análise foi realizada por 2 avaliadores de forma cega.

6. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk' foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA one-way), seguidas do post-hoc de Tukey. Nos casos não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do teste de Dunn para discriminar as diferenças. As análises foram realizadas no software GraphPadPrism, versão 6.01. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1. Análise Histológica

Após 15 dias do procedimento cirúrgico a análise histológica qualitativa para o grupo Controle indicou algumas áreas com a presença de osteóides e tecido de granulação, ainda foi observado osso neoformado em pequenas quantidades ao longo do defeito ósseo (Figura 3A e 3B). O grupo BS/SPG apresentou uma degradação inicial do biomaterial, maiormente no centro do defeito ósseo, acompanhada de neoformação óssea e osteóides, principalmente, nas periferias do defeito ósseo (Figura 3C e 3D). Seguindo a mesma linha, a análise histológica para o grupo BS/SPG + PBM, após 15 dias de implantação, mostrou um padrão semelhante ao encontrado para o grupo sem associação com a fotobiomodulação (Figura 3E e 3F). Dessa maneira, foi observada uma degradação inicial do material, além da presença de osso neoformado nas periferias do defeito (Figura 3E e 3F).

Adicionalmente, para este grupo experimental partículas do biomaterial rodeadas por tecido de granulação foram observadas no centro do defeito (Figura 3E e 3F). Os achados histológicos para o grupo Controle, 45 dias após a implantação, indicaram áreas de osso com aspecto mais maduro e osso neoformado em toda extensão do defeito (Figura 4A e 4B). Além disso, para este grupo tecido de granulação e osteóides foram observados em toda a extensão do defeito (Figura 4A e 4B). Para o grupo BS/SPG uma maior degradação do biomaterial foi

observada ao longo do defeito com a presença de poucas partículas remanescentes, circundadas por porções de osteóides, após 45 dias de implantação (Figura 4C e 4D). Ainda, para esses animais, foi possível observar a presença de osso neoformado em toda a extensão do defeito e com aspecto maduro na margem (Figura 4C e 4D). Achados semelhantes foram observados na análise histológica para o grupo BS/SPG + PBM, 45 dias após a cirurgia, com poucas partículas do biomaterial apresentadas ao longo do defeito (Figura 4E e 4F). Além disso, foram observados osso neoformado (com aspecto mais maduro) e osteóides, preenchendo a maior parte do defeito, com algumas áreas de tecido de granulação no centro para este grupo (Figura 4E e 4F).

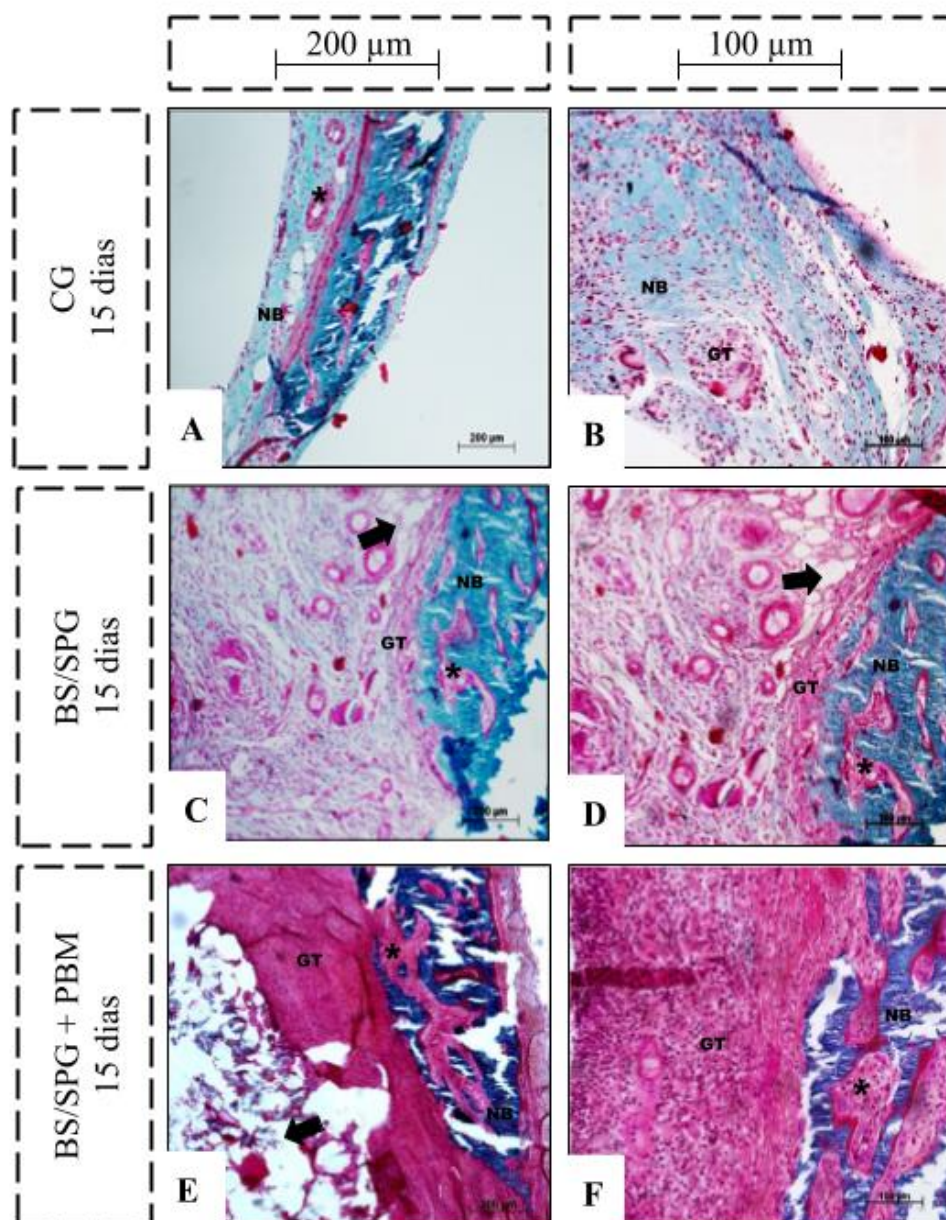


Figura 3. Fotos histológicas representativas dos grupos: CG (A, B); BS/SPG (C, D); BS/SPG +PBM (E, F), 15 após a cirurgia, nos aumentos de 10x e 20x respectivamente. Osso neoformado (NB), Osteóide (*), Resíduos de material (seta). Coloração de Tricrômio de Goldner. 200 μ m (mag. X10) e 100 μ m (mag. X20)

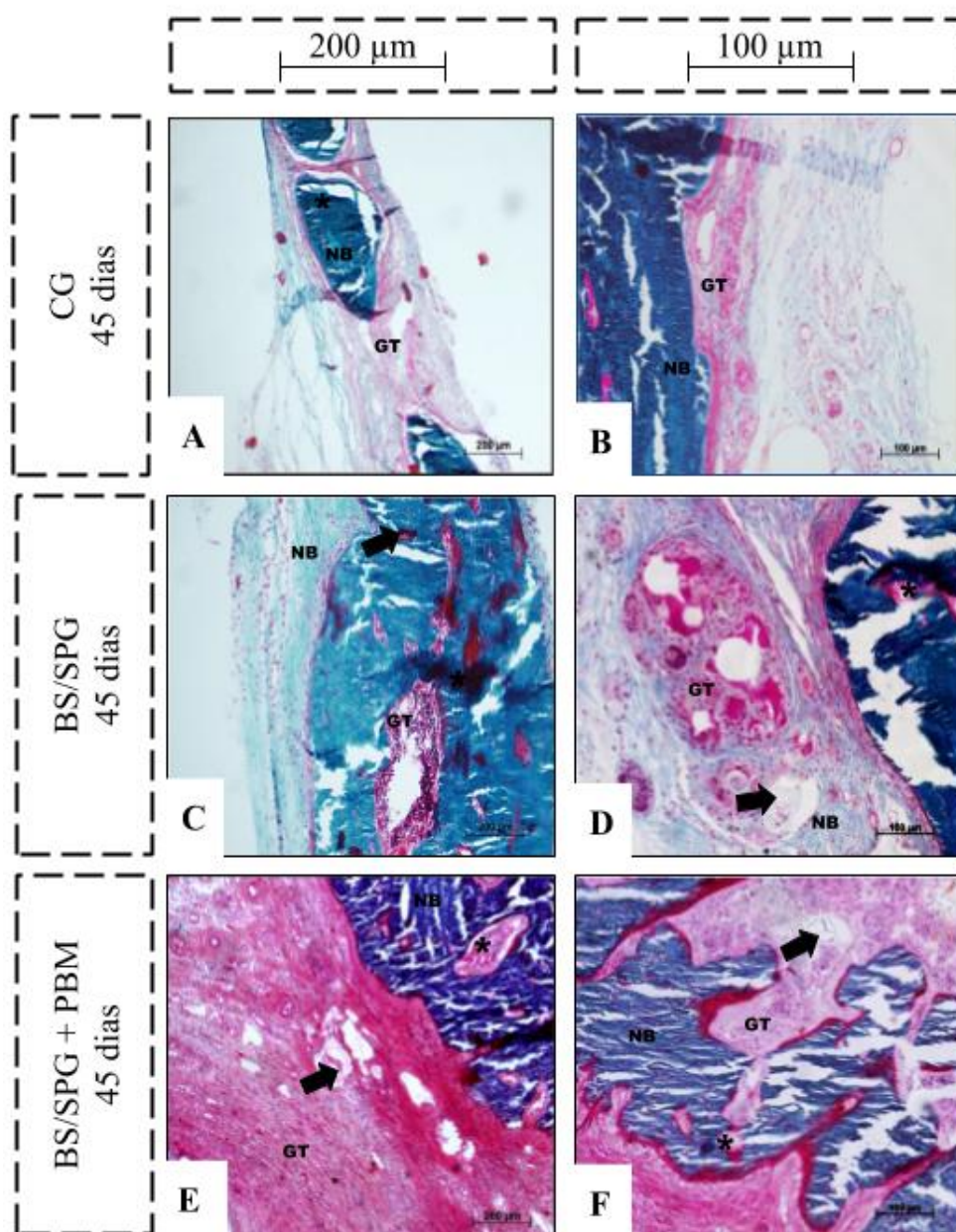


Figura 4. Fotos histológicas representativas dos grupos: CG (A, B); BS/SPG (C, D); BS/SPG + PBM (E, F), 45 após a cirurgia, nos aumentos de 10x e 20x respectivamente. Osso neoformado (NB), Osteóide (*), Resíduos de material (seta). Coloração de Tricrômio de Goldner. 200 μ m (mag. X10) e 100 μ m (mag. X20).

7.2. Análise Morfométrica

A análise histomorfométrica quantitativa demonstrou que houve diferença estatística observada para BV/TV (%) no período de 15 Dias (Figura 5). O grupo BS/SPG + PBM apresentou maior valor significativo para essa variável, tanto comparado ao grupo Controle quanto ao grupo BS/SPG ($p=0,0284$ e $p=0,0175$, respectivamente) (Figura 5). Já para o período de 45 dias, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos analisados.

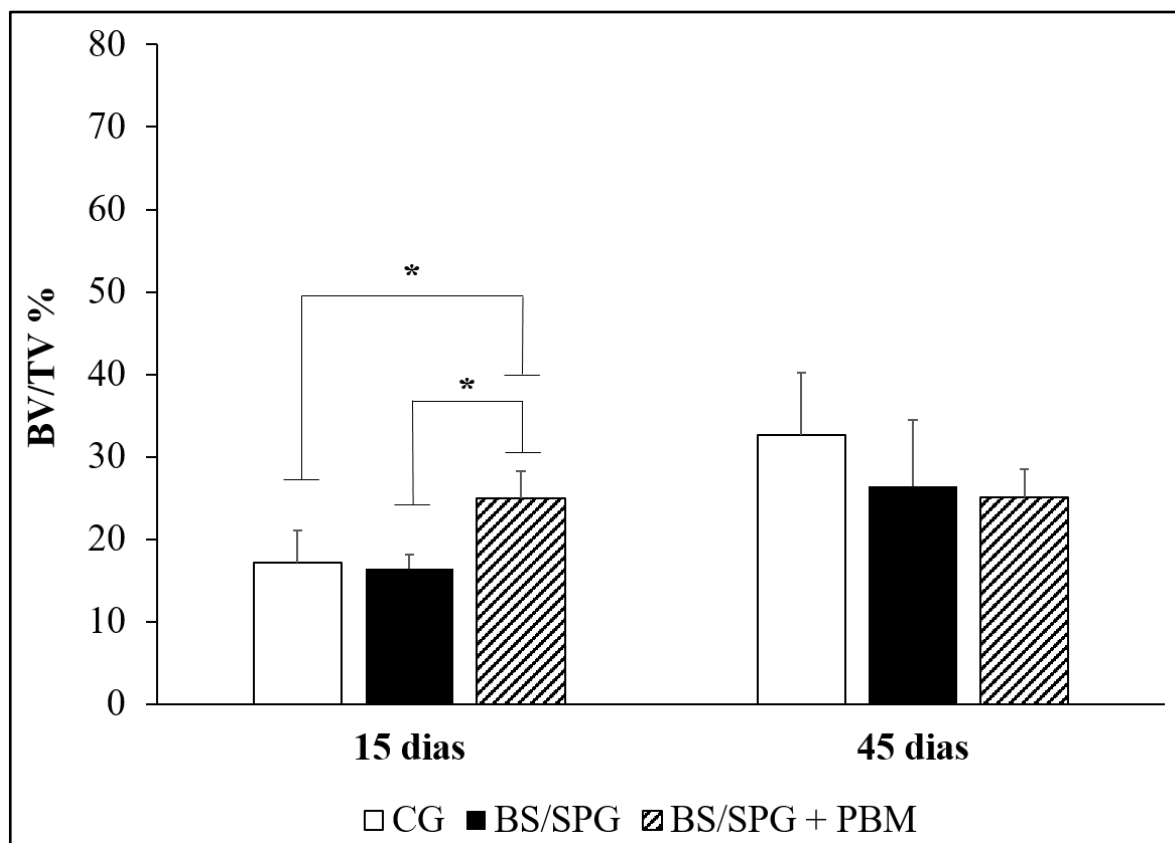


Figura 5. Média e desvio padrão de BV/TV (%) para os grupos: CG, BS/SPG e BS/SPG + PBM, 15 e 45 após a cirurgia. Teste de Dunn's. * $p < 0,05$

Para OV/TV (%) no período de 15 dias após a cirurgia valores significativamente maiores foram encontrados para o grupo BS/SPG + PBM quando comparado ao grupo BS/SPG ($p = 0,0029$) (Figura 6). Ainda, 45 dias após a cirurgia, para esta mesma variável um valor significativamente maior foi verificado para o grupo BS/SPG + PBM comparado com os grupos BS/SPG e Controle ($p=0,0148$ e $p=0,0332$, respectivamente) (Figura 6).

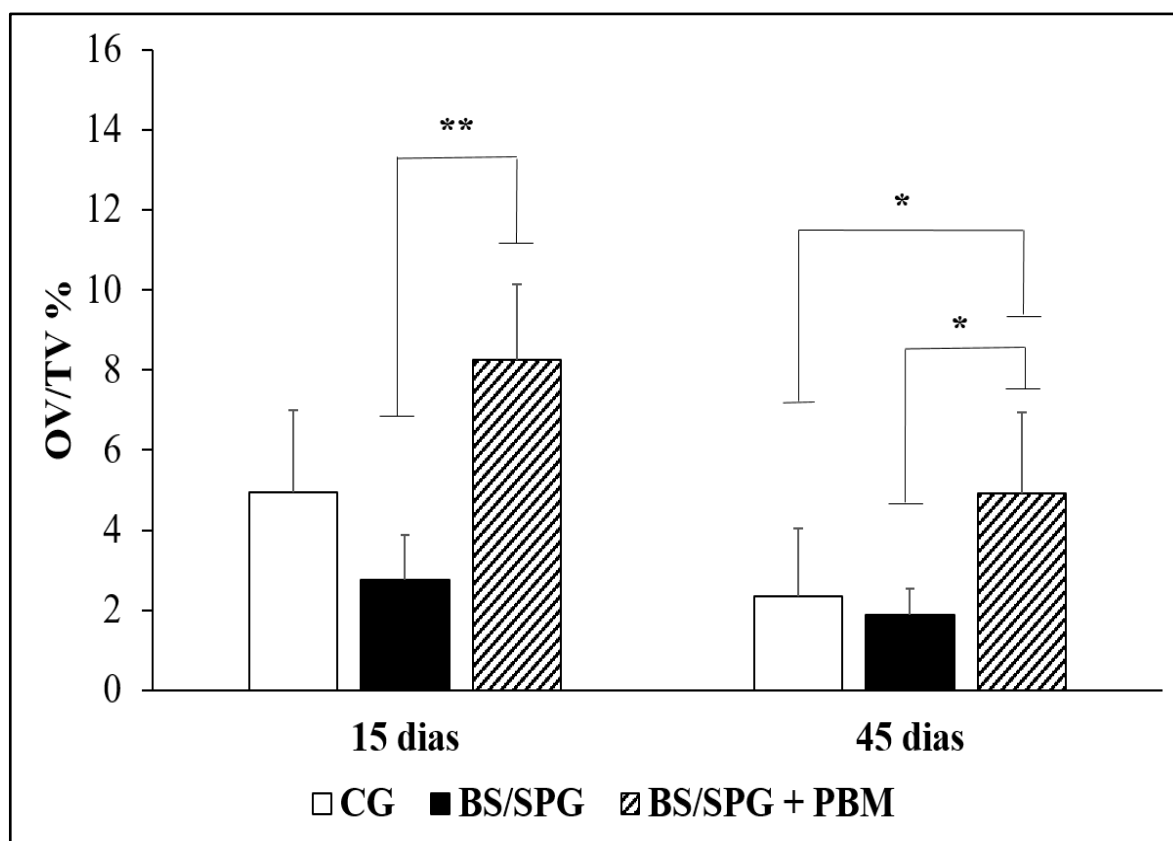


Figura 6. Média e desvio padrão de OV/TV (%) para os grupos: CG, BS/SPG e BS/SPG + PBM, 15 e 45 dias da cirurgia. Teste de Dunn's. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

Para O. Th (μm) no período de 15 dias após a cirurgia, um aumento significativo foi encontrado para o grupo BS/SPG + PBM, quando comparado ao grupo Controle ($p=0,0284$) (Figura 7). Além disso, após 45 dias da cirurgia, também se pode observar um aumento significativo para os valores do grupo BS/SPG + PBM, quando comparado ao grupo Controle ($p=0,0011$) (Figura 7).

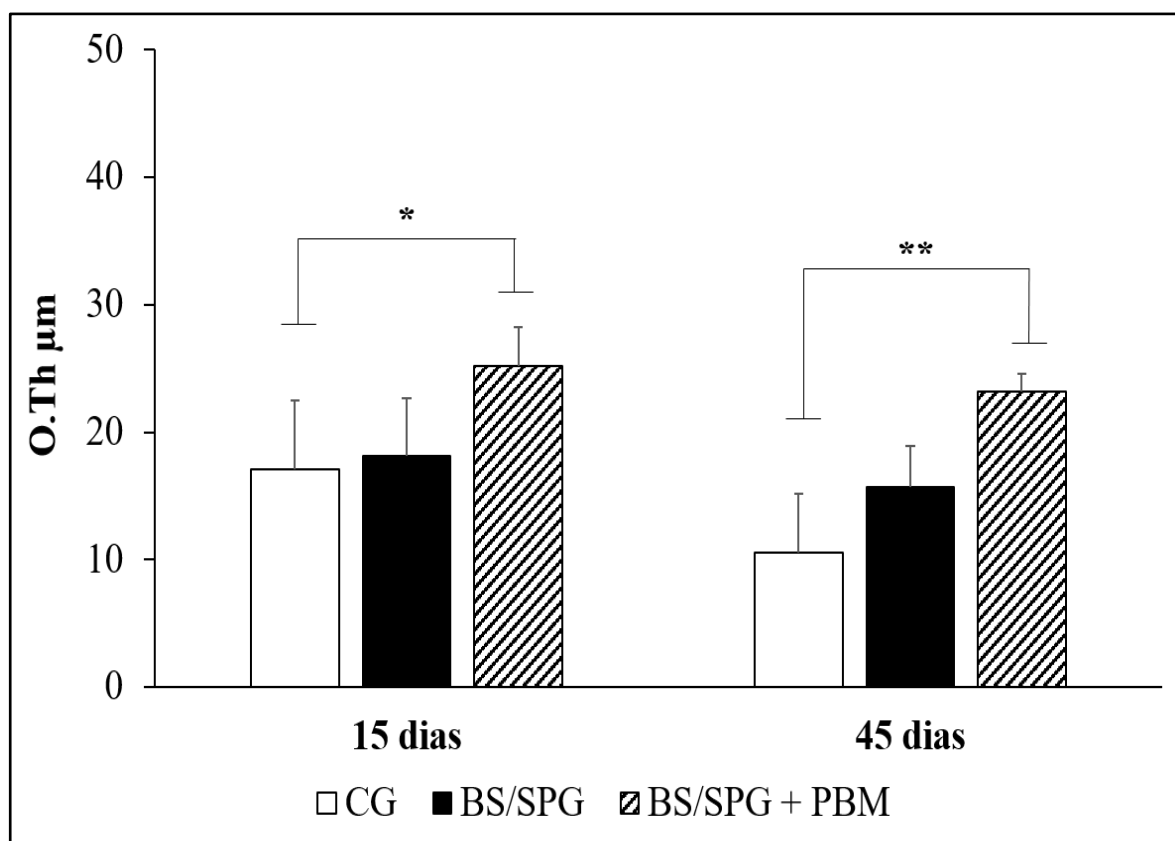


Figura 7. Média e desvio padrão de O. Th (μm) para os grupos: CG, BS/SPG e BS/SPG + PBM, 15 e 45 dias após a cirurgia. Teste de Dunn's. * p < 0,05 e ** p < 0,01.

7.3. Análise Imunohistoquímica

TGF-β

A figura 8 representa a análise imunohistoquímica qualitativa de TGF-β para todos os grupos experimentais, 15 e 45 dias pós-cirurgia. Para o grupo Controle, em ambos os períodos, foi possível observar a imunomarcagem de TGF-β nas fibras do tecido conjuntivo presentes ao longo do defeito ósseo (Figura 8A e 8D). No grupo BS/SPG, a imunomarcagem de TGF-β foi verificada em torno das partículas dos materiais e no tecido conjuntivo e de granulação ao longo do defeito ósseo, 15 e 45 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 8B e 8E). Ainda, o grupo BS/SPG + PBM, a imunomarcagem de TGF-β também foi verificada em torno das partículas dos materiais no defeito ósseo em ambos os períodos experimentais (Figura 8C e 8F). Além disso, após 45 dias de cirurgia, também foi observada a imunomarcagem no tecido conjuntivo e de granulação para este grupo no centro do defeito (Figura 8F).

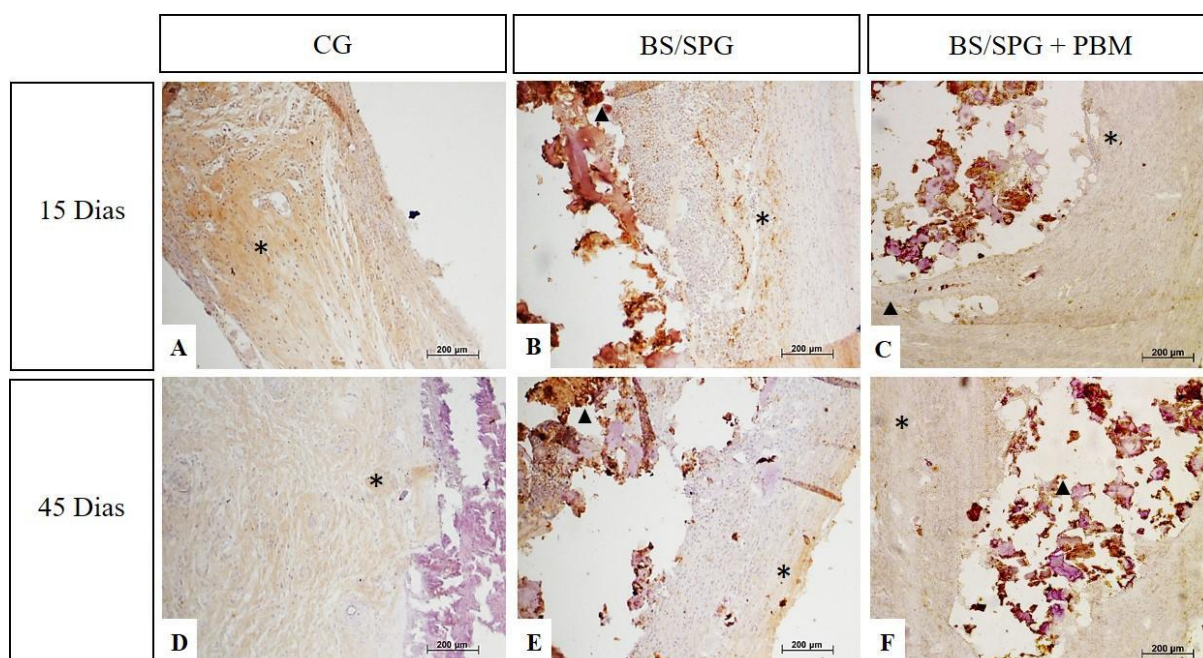


Figura 8. Fotos representativas para imunohistoquímica de TGF- β dos grupos: CG (A, D); BS/SPG (B, E); BS/SPG + PBM (C, F), 15 e 45 dias após a cirurgia, respectivamente. Imunomarcacão de TGF- β (*) e biomaterial (▲). 200 μ m (mag. X10).

Os dados da análise semi-quantitativa da imunomarcacão de TGF- β , 15 e 45 dias após a cirurgia é mostrada na Figura 9. No primeiro período experimental não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais. Já em 45 dias após a cirurgia foi observado um aumento significativo entre BS/SPG + PBM e o grupo controle ($p= 0.0340$).

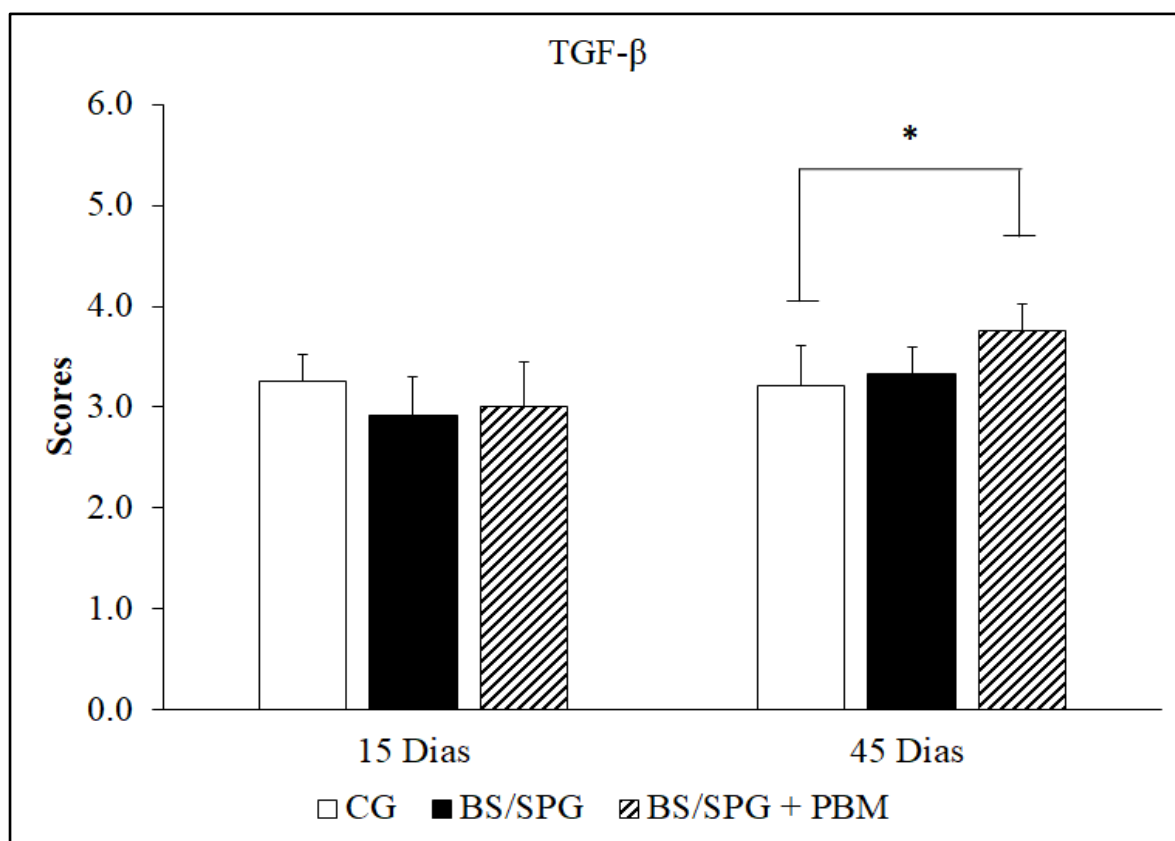


Figura 9. Média e desvio padrão dos escores da imunomarcção de TGF- β para os grupos: CG, BS/SPG e BS/SPG + PBM, 15 e 45 dias após a cirurgia. Teste de Dunn's. * $p < 0,05$

VEGF

A figura 10 representa a análise imunohistoquímica qualitativa de VEGF para todos os grupos experimentais, 15 e 45 dias pós-cirurgia. Em ambos os períodos experimentais, a imunomarcção de VEGF foi observada nas fibras do tecido conjuntivo ao longo do defeito ósseo no grupo Controle (Figura 10A e 10D). No grupo BS/SPG a imunomarcção de VEGF foi verificada em torno das partículas dos materiais e no tecido conjuntivo e de granulação ao longo do defeito ósseo em ambos os períodos (Figura 10B e 10E).

Achados semelhantes foram observados para o grupo BS/SPG + PBM nos dois períodos experimentais. Foi observada a imunomarcção de VEGF no tecido conjuntivo e de granulação para este grupo no centro do defeito, além de estar presente em torno das partículas dos materiais (Figura 10C e 10F).

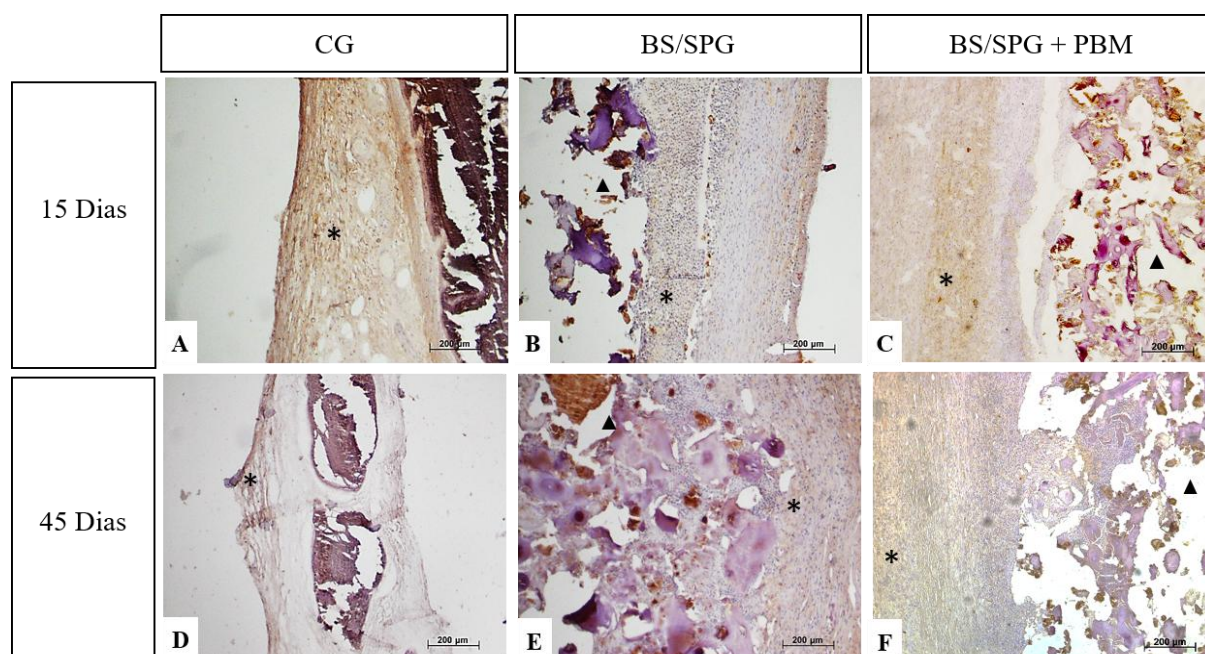


Figura 10. Fotos representativas para imunohistoquímica de VEGF dos grupos: CG (A, D); BS/SPG (B, E); BS/SPG + PBM (C, F), 15 e 45 dias após a cirurgia, respectivamente. Imunomarcção de VEGF (*) e biomaterial (▲). 200 µm (mag. X10).

Os dados da análise semi-quantitativa da imunomarcção de VEGF após 15 e 45 dias após a cirurgia é mostrada na Figura 11. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais no primeiro período analisado. Entretanto, 45 após a cirurgia, é possível observar um aumento significativo da imunomarcção de VEGF dos grupos BS/SPG e BS/SPG + PBM quando comparado ao grupo Controle ($p=0,0334$ e $p=0,0068$, respectivamente).

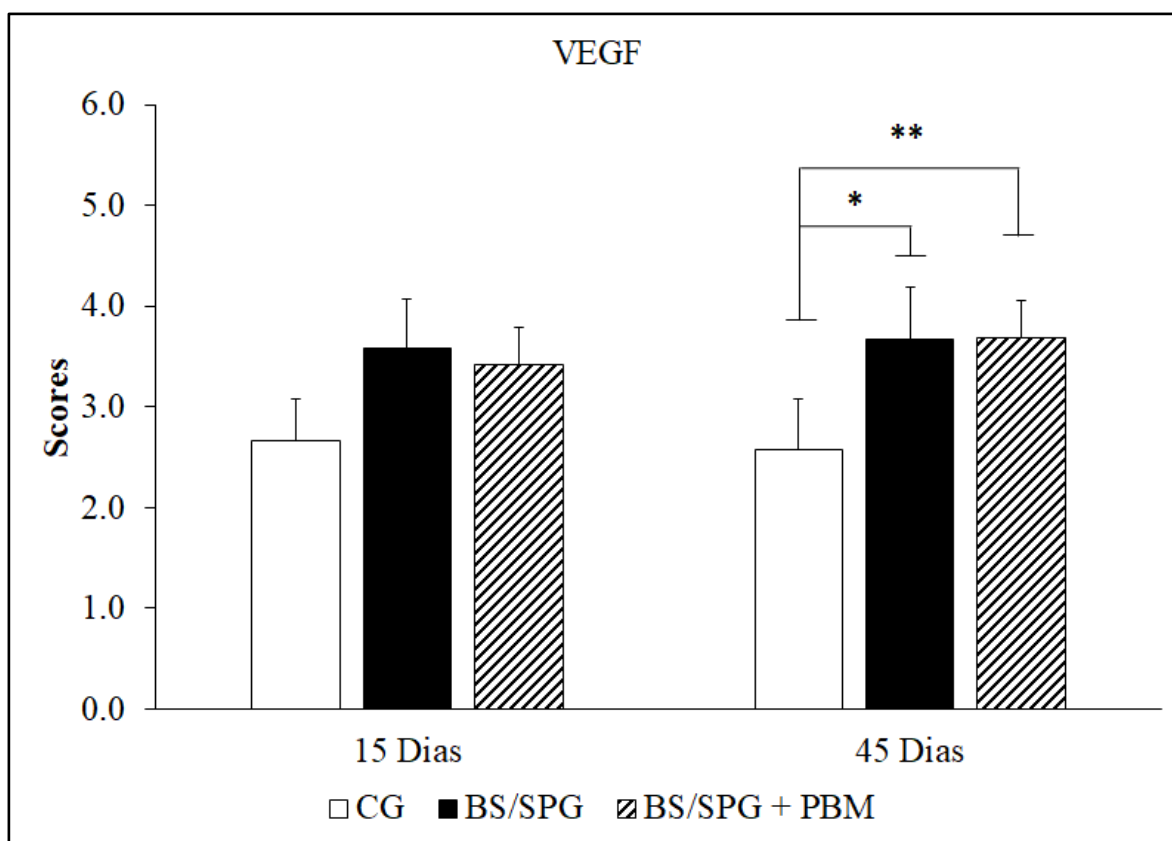


Figura 11. Média e desvio padrão dos escores da imunomarcação de VEGF para os grupos: CG, BS/SPG e BS/SPG + PBM, 15 e 45 dias após a cirurgia. Teste de Dunn's. *p < 0,05 e ** p < 0,01.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou as propriedades biológicas da introdução de um componente orgânico (SPG) em BS (componente inorgânico), com o objetivo de produzir um osso composto biomimético ao osso, como também avaliou a associação fotobiomodulação deste biomaterial na cicatrização de um defeito ósseo craniano crítico em ratos, após 15 e 45 dias. Foi levantada a hipótese que a incorporação de SPG em BS resultaria em um biomaterial biocompatível e que a associação com a fotobiomodulação poderia constituir uma intervenção terapêutica altamente inovadora e eficaz para uma melhor formação de tecido ósseo e aceleração do processo de reparo.

Em relação à metodologia utilizada, é importante ressaltar que o modelo de defeitos circulares no tecido ósseo para investigar a ação de agentes terapêuticos na osteogênese, dentre eles a terapia de fotobiomodulação, estão elucidados na literatura (TIM *et al.* 2014; PINTO *et al.* 2013; UENO *et al.* 2016). A fotobiomodulação atualmente, é uma das modalidades mais utilizadas na reabilitação. Muitos autores demonstraram que a mesma é

capaz de estimular o crescimento ósseo e a cicatrização de fraturas (MAGRI *et al.*, 2015; ACAR *et al.*, 2016; MEDALHA *et al.*, 2016; SARVESTANI *et al.*, 2017).

A análise histológica demonstrou que os animais BS/SPG irradiados com PBM após 15 dias da cirurgia apresentaram uma degradação do material inicial do material, além da presença de osso neoformado nas periferias do defeito, da mesma maneira que os animais do grupo BS/SPG. Após 45 dias da cirurgia tanto para o grupo Biosilicato®/Espongina e o grupo Biosilicato®/Espongina irradiados com PBM foi observado a presença de osso neoformado em toda a extensão do defeito e uma maior degradação do biomaterial ao longo do defeito com a presença de poucas partículas remanescentes, circundadas por porções de osteóides. É importante ressaltar que um aspecto de osso neoformado mais maduro foi observado nos dois períodos experimentais para o grupo Biosilicato®/Espongina irradiados com PBM. Além disso, não foi observada resposta inflamatória nos animais tratados com o biomaterial, indicando a biocompatibilidade da BS e SPG.

Dessa maneira, os achados histológicos demonstraram que os *scaffolds* de BS/SPG (com ou sem PBM) degradaram-se ao longo do tempo, liberando espaço na área afetada e permitindo o crescimento de tecidos. Dados que corroboram com o estudo de Fernandes *et al.* (2017), que também evidenciaram um aumento da degradação do material implantado.

Na análise histomorfométrica valores elevados BV/TV (%) no período inicial da regeneração óssea foram encontrados no grupo Biosilicato®/Espongina irradiados com PBM, quando comparados com grupo Controle e BS/SPG. Ainda, para OV/TV (%) e O.Th (µm), valores mais altos foram observados no grupo BS/SPG + PBM, comparado aos demais grupos experimentais, nos dois períodos analisados. Demonstrando os efeitos positivos da PBM no processo de cicatrização neste estudo que podem ser explicados pelo fato de a PBM ser capaz de estimular células mesenquimais e osteoblastos, culminando no aumento da deposição óssea recém-formada (SANTINONI *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2017; NOBA *et al.*, 2018; SKONDRA *et al.*, 2018).

Além disso, os resultados encontrados sugerem que a energia do PBM foi adequada para estimular adequadamente as células ósseas e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de osso recém-formado, produzindo a cicatrização do defeito ósseo craniano.

Adicionalmente, a combinação de materiais com o objetivo de obter materiais biomiméticos ósseos (por exemplo, BS e Col) pode ser uma estratégia muito promissora para propostas de engenharia de tecidos ósseos. Os compostos que imitam a composição óssea, como a associação de Col (representando a parte orgânica) com a BG (parte inorgânica), têm demonstrado propriedades biológicas aprimoradas no processo de cicatrização óssea (UENO

et al., 2016; LOPEZ-HEREDIA *et al.*, 2012). Dessa maneira, a adição de SPG (na porcentagem de 20%) e a aplicação da PBM acelerou a deposição de tecido ósseo, já que os valores histomorfométricos dos volumes ósseo e osteóide, bem como a espessura dos osteóides, foram maiores nos dois períodos experimentais.

No presente estudo, foi demonstrado também uma maior marcação imunohistoquímica para TGF- β observada nos animais tratados com PBM, dessa maneira é possível evidenciar a influência da PBM na proliferação de células osteoblásticas, o que pode culminar no aumento da deposição óssea recém-formada. O TGF- β desempenha uma função importante na remodelação óssea, estimulando a síntese de proteínas da matriz e a proliferação de osteoblastos (WU *et al.*, 2016; YI *et al.*, 2018). Similarmente aos achados desse estudo, Mokoena *et al* (2018), em uma revisão demonstraram que o PBM é capaz de estimular a marcação de TGF- β .

O mesmo ocorreu com VEGF, em que foi encontrado maior expressão para este imunomarcador 45 dias após a cirurgia para os grupos BS/SPG + PBM e BS/SPG. Cabe ressaltar que para um processo de cicatrização adequado, é necessária uma vascularização adequada e o VEGF é o principal mediador para a formação de novos vasos sanguíneos (JOHNSON e WILGUS, 2014). Alguns autores apontam que a PBM é capaz de aumentar a formação de novos capilares por meio da liberação de fatores de crescimento, como o VEGF (WANG *et al.*, 2009). Ainda, foi relatado que a BS tem um efeito estimulador na neovascularização, estimulando a secreção de fatores angiogênicos (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015, GRANITO *et al.*, 2009, HENCH *et al.*, 2002). Esse fato, associado às propriedades osteopromotoras do BS, pode influenciar precocemente a formação óssea. Além disso, o estudo conduzido por D'Mello *et al.* (2015), utilizando um material biomimético (contendo col), observaram uma imunocoloração positiva para o fator VEGF em um defeito da calvária de ratos. Dessa forma, considera-se que a imunoexpressão de TGF- β do VEGF encontrados no tecido ósseo também possam favorecer o processo de reparo ósseo.

Diante desse contexto, biomateriais com diferentes composições e estrutura têm sido extensivamente estudados para propostas de engenharia de tecidos ósseos. Dessa maneira, foi estudado um material compósito, incluindo BS enriquecido com um colágeno marinho. De fato, a introdução de SPG na BS e a associação com PBM induziram uma resposta mais apropriada para estimular o metabolismo ósseo, principalmente no início do reparo. Além disso, os dados do presente estudo destacam o enorme potencial biológico do SPG a ser usado como parte orgânica para melhorar o desempenho dos enxertos ósseos. Como o presente estudo se limitou a uma avaliação relativamente a curto prazo dos efeitos dos compósitos e

PBM, informações detalhadas sobre o desempenho a longo prazo ainda devem ser fornecidas. Seguindo essa linha, novas investigações são necessárias para validar essas combinações como materiais seguros e eficientes para aplicações biomédicas, com o objetivo de aplicar as intervenções terapêuticas em ensaios clínicos.

9. CONCLUSÃO

Em conclusão, pode-se dizer que o estímulo fornecido pelo PBM associado ao compósito biomimético aumentou a formação óssea no defeito ósseo craniano em ratos. Consequentemente, esses dados destacam o potencial da introdução de SPG na BS e irradiados com PBM para melhorar o desempenho biológico para aplicações de regeneração óssea. No entanto, novos estudos devem ser realizados para investigar a degradação do material e a regeneração óssea induzidas nos estágios finais pelo BS/SPG e PBM.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, A. *et al.* Bone regeneration by low- level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. Arch. Oral. Biol., v. 61, p. 60-5, 2016.
- Amid, R. *et al.* Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. J. Lasers Med. Sci., v. 5, p. 163-70, 2014.
- Assis, L.; Moretti, A. L.; Abrahão, T. B. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. Lasers Med. Sci., v. 28, n. 3, p. 947-55, 2013.
- Assis, L. *et al.* Effect of low-level laser therapy (808 nm) on skeletal muscle after endurance exercise training in rats. Braz. J. Phys. Ther., São Carlos, v. 19, n. 6, p. 457-465, 2015.
- Aziziyeh, R. *et al.* The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. J. Med. Econ., v. 22, n. 7, p. 638-644, Jul 2019.
- Baccaro, L.F. *et al.* The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: A viewpoint from Brazil. Clinical Interventions in Aging. 2015.
- Bell, J.J.; Barnes, D. K. A. The use of sponge morphological diversity as a qualitative predictor of species diversity. Aquatic Conservation: Marine and Fresh water Ecosystems, v. 11, p. 109-121, 2001.

Bossini, P. S., *et al.* *Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats.* J. Tissue Eng. Regen. Med., v. 5, n. 3, p. 229-37, 2011.

Bossini, P. S., *et al.* *Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages.* Exp. Gerontol., v. 47, n. 2, p. 136-42, 2012.

Briteno-vazquez, M., *et al.* *Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis.* Lasers Med. Sci., v.30, p.333-8, 2015.

Calori, G.M., *et al.* *Risk factors contributing to fracture non-unions.* Injury, v. 38, n. 2, p. S11-8, 2007.

Carvalho, A. F. M., *et al.* *The low-level laser on acute myositis in rats.* Acta. Cir. Bras., São Paulo, v. 30, n. 12, p. 806-811, 2015.

Cen, L. *et al.* *Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications.* Pediatr. Res. v. 63, n. 5, p. 492-6, 2008.

Claes, L.; Willie, B. *The enhancement of bone regeneration by ultrassound.* Prog. Biophys Mol. Biol. v. 93, p. 384-398, 2007.

Claes, L.; Recknagel, S.; Ignatius, A. *Fracture healing under healthy and inflammatory conditions.* Nat. Rev. Rheumatol., v. 8, n. 3, p. 113-143, 2012.

Constantino, L. *et al.* *TSH fraction from Petromica citrina: A potential marine natural product for the treatment of sepsis by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Biomed. Pharmacother., v. 108, p. 1759-1766, 2018.

Dimitriou, R. *et al.* *Bone regeneration: current concepts and future directions.* BMC Medicine. v. 9, p. 1-10, 2011

D'Mello, S. R., *et al.* *A Pilot Study Evaluating Combinatorial and Simultaneous Delivery of Polyethylenimine-Plasmid DNA Complexes Encoding for VEGF and PDGF for Bone Regeneration in Calvarial Bone Defects.* Curr. Pharm. Biotechnol., v. 16, p. 655-60, 2015.

Fantinati, M. S. *et al.* *Activity of low level laser therapy on burning wounds in diabetic rats.* Rev. bras. queimaduras, v. 15, p. 42-49, 2016.

Fávaro-pipi, E. *et al.* *Comparative study of the effects of low- intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats.* Lasers Med. Sci., v. 25, p. 727-732, 2010.

Fávaro-pipi, E. *et al.* *Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats.* Photomed Laser Sur., v. 29, n. 5, p. 311-317, 2011.

Fernandes, K. R. *et al.* *Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats.* J. Biomed. Opt., v.18, n. 3, p. 6, 2013.

Fernandes, K. R. *et al.* *Characterization and biological evaluation of the introduction of PLGA into biosilicate(R).* J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., v. 105, n. 5, p. 1063-1074, 2016.

Fernandes, K. R. *et al.* *Biosilicate/PLGA osteogenic effects modulated by laser therapy: In vitro and in vivo studies.* J. Photochem. Photobiol., v. 173, p. 258-265, 2017.

Fernandes, K. R., *et al.* *Influence of the incorporation of marine spongin into a Biosilicate®: an in vitro study.* J. Mater. Sci. Mater. Med., v. 30, n. 6, p. 84, 2019.

Gabbai-Armelin, P. R. *et al.* *Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair.* J. Mater. Sci. Mater. Med., v. 26, p. 177, 2015.

Galitz, A. *et al.* *Identification of an aquaculture poriferan "Pest with Potential" and its phylogenetic implications.* PeerJ. v. 6, p. 5586, 2018.

Gökalp, M. *et al.* *Development of an Integrated Mariculture for the Collagen-Rich Sponge Chondrosia reniformis.* Mar. Drugs. v. 17, n. 1, 2019.

Granito, R. N. *et al.* *Effects of 70 biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study.* J. Mater. Sci.: Mater. Med., v. 20, p. 2521-26, 2009.

Granito, R. N.; Custódio, M. R.; Rennó, A. C. M. *Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives.* J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., v. 105B, p. 1717–1727, 2017.

Green, D. *et al.* *Natural marine sponge fiber skeleton: a biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation.* Tissue Eng., v. 9, n. 6, p. 159-66, 2003.

Haach, L. C. A. *et al.* *Comparison of two composites developed to be used as bone replacement—PMMA/bioglass 45S5® microfiber and PMMA/hydroxyapatite.* Bioceram. Dev. Appl., v. 4, p. 71, 2014.

Heinemann, S. *et al.* *Ultrastructural studies on the collagen of the marine sponge Chondrosia reniformis Nardo.* Biomacromolecules. v. 8, n. 11, p. 3452-7, 2007.

Hench, L. L.; Polak, J. M. *Third-generation biomedical materials.* Science. v. 295, p. 1014-7, 2002.

Hench, L. L. *The future of bioactive ceramics.* J. Mater. Sci. Mater. Med., v. 26, n. 2, p. 86, 2015.

Hodler, J.; Kubik-Huch, R. A.; Von Schulthess, G. K. *Musculoskeletal Diseases 2017-2020: Diagnostic Imaging*. 1st ed. Editora Springer, 2017.

Johnson, K. E.; Wilgus, T. A. *Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair*. *Adv. Wound. Care*. v. 3, p. 647–66, 2014.

Jones, J. R. *Reprint of: Review of bioactive glass: from Hench to hybrids*. *Acta. Biomater.* v. 23, Suppl:S, p. 53-82, 2015.

Kanis, J.A. *et al. Characteristics of recurrent fractures*. *Osteoporosis International*. v. 29, n. 8, p. 1747–1757, 2018.

Karu, T. *Laser biostimulation: a photobiological phenomenon*. *J. Photochem. Photobiol. B*. v. 3, n. 4, p. 638-40, 1989.

Karu, T. I., Kolyakov, S. F. *Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy*. *Photomed. Laser Surg.* v. 23, n. 4, p. 355-61, 2005.

Kido, H. W. *et al. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glassceramic scaffolds*. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v. 101, n. 3, p.667-73, 2013.

Kido, H. W. *et al. Porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) acid/biosilicate(R) composite scaffolds for bone tissue engineering*. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v. 105, n. 1, p. 63- 71, 2015.

Kido, H.W. *et al. Vacuumed collagen-impregnated bioglass scaffolds: Characterization and influence on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. 2018.

Kim, M. M. *et al. Effect of spongin derived from Hymeniacidon sinapium on bone mineralization*. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v. 90, n. 2, p. 540-6, 2009.

Kim, S.W. *et al. Fabrication of Porous Titanium Scaffold with Controlled Porous Structure and Net-shape Using Magnesium as Spacer*. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. v. 33, n. 5, p. 2808-2815, 2013.

Kweon, S.M. *et al. Male patients with rheumatoid arthritis have an increased risk of osteoporosis*. *Medicine*. v. 97, n. 24, p. 11122, 2018

Leys S. P.; Hill, A. *The physiology and molecular biology of sponge tissues*. In: *Advances in marine biology*, vol 62, 2012.

Lin, Z. *et al.* *In vitro* evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Sci.*, v. 7, n. 7, p. 968-77, 2011.

Liu WC. *et al.* *Angiogenesis Assays for the Evaluation of Angiogenic Properties of Orthopaedic Biomaterials – A General Review.* *Adv. Healthcare Mater.* v. 6, n.5, p. 1600434, 2017.

Lopez-Heredia, M. A. *et al.* *Bulk properties and bioactivity assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with calcium phosphates under simulated physiological conditions.* *Acta. Biomater.*, v. 8, p. 3120–7, 2012.

Magri, A. M., *et al.* *Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model.* *Lasers Med. Sci.*, v. 30, p. 1949-57, 2015.

Marsell, R.; Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury*, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.

Matsumoto, M. A., *et al.* *A novel bioactive vitroc ceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts.* *J Mater Sci Med.*, v. 23, n. 6, p. 1447-56, 2012.

Medalha, C. C. *et al.* *Low level laser therapy accelerates bone healing in spinal cord injured rats.* *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 159, p. 179-85, 2016.

Moura Neto, J. *et al.* *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, v. 82, n. 3, p. 545-57, 2007.

Mokoena, D. *et al.* *Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing.* *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 189, p. 138-144, 2018.

Muricy, G.; Hajdu, E. *Porifera Brasilis: Guia de identificação das esponjas marinhas mais comuns do sudeste do Brasil.* Série Livros 17. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 2006.

Muricy, G. *et al.* *Catalogue of Brazilian Porifera.* Museu Nacional, Série Livros, 300 p., 2011.

Nandi, S. K. *et al.*, *In vitro* and *in vivo* evaluation of marine sponge skeleton as a bone mimicking biomaterial. *Integr. Biol.*, v. 7, n. 2, p. 250-262, 2014.

Noba, C. *et al.* *Laser for bone healing after oral surgery: systematic review.* *Lasers Med. Sci.*, v. 33, p. 667-674, 2018.

Oliveira, F. S. *et al.* *Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon.* *Lasers Surg. Med.*, v. 41, p. 271-6, 2009.

Oliveira, M. R. L.; Nicolodi, J. L. *A Gestão Costeira no Brasil e os dez anos do Projeto Orla. Uma análise sob a ótica do poder público*. Revista de Gestão Costeira Integrada - Journal of Integrated Coastal Zone Management., v. 12, n. 1, p. 91-100, 2012.

Oliveira, P. *et al.* *Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade associado ao Biosilicato® no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos*. Rev. bras. ortop., São Paulo, v. 47, n. 1, p. 102-107, Feb. 2012.

Oliveira, F. A. *et al.* *Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation*. J. Photochem. Photobiol. B, v.163, p.14-21, 2016.

Pape, H. C. *et al.* *Trauma-Induced Inflammation and Fracture Healing*. J. Orthop. Trauma, v. 24, p. 9, 2010.

Pallela, R. *et al.* *Biophysicochemical evaluation of chitosan-hydroxyapatite-marine sponge collagen composite for bone tissue engineering*. J. Biomed. Mater. Res. Part A, v. 100A, p. 486–495, 2012.

Prindeze, N. J., Moffatt, L. T., Shupp, J. W. *Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions*. Exp. Biol. Med. (Maywood). v. 11, p. 1241-8, 2012.

Parisi, J.R. *et al.* *Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongin) into Hydroxyapatite Samples: Characterization and In Vitro Biological Evaluation*. Marine Biotechnology. v. 21, Issue 1, p. 30–37, 2019.

Parfitt, A. M. *et al.* *Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system)*. Bone, 1988.

Patrocínio-silva, T. L. *et al.* *The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats*. Lasers Med. Sci., v. 29, p. 1357-64, 2014.

Pedrosa, W. F. *et al.* *Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone*. Clin Oral Implants Res, v.20, p.1254-64, 2009.

Pinto, K. N. *et al.* *Effects of biosilicate (R) scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing*. Photomed. Laser Surg., v.31, p.252-60, 2013.

Quarto, R.; Giannoni, P. *Bone Tissue Engineering: Past-Present-Future*. Methods Mol. Biol., v. 1416, p. 21-33, 2016.

Ravagnani, C. *Biosilicato® para promoção da saúde oral*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 161, 2003.

Rennó, A. C. *et al.* *The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro.* Photomed. Laser Surg., v. 25, n. 4, p. 27580, 2007.

Santinoni, C. D. *et al.* *Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review.* J. Photochem. Photobiol., v. 169, p. 83-89, 2017.

Sarvestani, F. K. *et al.* *Effect of low-level laser therapy on fracture healing in rabbits.* Laser Ther., v. 26, n. 3, p. 189-193, 2017.

Silva, T. H. *et al.* *Marine Origin Collagens and Its Potential Applications.* Mar. Drugs. v. 12, p. 58815901, 2014.

Skondra, F. G. *et al.* *The Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Healing After Rapid Maxillary Expansion: A Systematic Review.* Photomed. Laser Surg., v. 36, p. 61-71, 2018.

Soares, L. G. P. *et al.* *New Bone Formation around Implants Inserted on Autologous and Xenografts Irradiated or not with IR Laser Light: A Histomorphometric Study in Rabbits.* Braz. Dent. J., Ribeirão Preto, v. 24, n. 3, p. 218-223, 2013.

Stanovici, J. *et al.* *Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery.* Curr. Res. Transl. Med., v. 64, n. 2, p. 83-90, 2016.

Swatschek, D. *et al.* *Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum.* Eur. J. Pharm. Biopharm. v. 53, n. 1, p. 107-13, 2002.

Tim, C. R. *et al.* *Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats.* Lasers Med. Sci., v.29, p.147-56, 2014.

Ueno, F. R. *et al.* *Calcium phosphate fibers coated with collagen: In vivo evaluation of the effects on bone repair.* Bio-Medical Materials and Engineering. v. 27, p. 259–27, 2016.

Wang, W.; Bergh, A.; Damberg, J.E. *Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory process.* Lasers Med Sci, v. 24, p. 195-201, 2009.

Wang, L. *et al.* *Characterization of porous polymethylmethacrylate space maintainers for craniofacial reconstruction.* J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater., v. 101, p. 813–25, 2013.

Wang, S. *et al.* *Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration.* Bone. v. 67, p. 292-304, 2014.

Winkler, T. F. A. *et al.* *Review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge.* Bone Joint Res. v. 7, p. 232-243, 2018.

Wu, M.; Chen, G.; Li, Y. P. *TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease*. Bone Res., v. 26, p. 16009, 2016.

Yu, W. *et al.* *Evaluation of zinc-doped mesoporous hydroxyapatite microspheres for the construction of a novel biomimetic scaffold optimized for bone augmentation*. International Journal of Nanomedicine, v. 12, p. 2293–2306, 2017.

Yi Guo, *et al.* *Monodispersed Bioactive Glass Nanoparticles Enhance the Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells through Activating TGF- β /Smad3 Signaling Pathway*. Part. Part. Syst. Charact., v. 35, p. 1800087, 2018.

11. ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da fotobiomodulação associada a compósitos de esponjina extraídas de esponjas marinhas e Biosilicato ® durante o processo de reparo ósseo", protocolada sob o CEUA nº 4331220318, sob a responsabilidade de **Ana Cláudia Muniz Rennó e equipe; Giovanna Caroline Aparecida do Vale** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 25/05/2018.

We certify that the proposal "Effects of photobiomodulation in association with composites of spongine extracted from marine sponges and Biosilicate during the bone repair", utilizing Isogenic rats, protocol number CEUA 4331220318, under the responsibility of **Ana Cláudia Muniz Rennó and team; Giovanna Caroline Aparecida do Vale** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/25/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2018 a 05/2019**

Área: **Biociências**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 3 meses**

N: **---**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **300 a 350 g**

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Biociências da UNIFESP - Baixada Santista. No entanto, o procedimento cirúrgico será realizado na sala específica para a realização de cirurgias e o tratamento com fotobiomodulação será realizado no Laboratório de Biomateriais e Engenharia tecidual da UNIFESP - Baixada Santista.

São Paulo, 28 de maio de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo